

## グリオーマ細胞糖脂質抗原の crypticity 機構の 解析とその生物学的意義に関する検討

布 村 克 幸

札幌医科大学医学部脳神経外科学講座 (主任 端 和夫 教授)

### Study on the Mechanisms of Crypticity of Ganglioside and its Biological Significance in Human Glioma Cells

Katsuyuki NUNOMURA

*Department of Neurosurgery, Sapporo Medical University School of Medicine*

(Chief : Prof. K. HASHI)

**ABSTRACT** We have already reported the cell density regulation of crypticity of gangliosides in human glioma cells. In the present study, we studied the mechanisms of the crypticity and discussed the biological significance of the ganglioside crypticity phenomenon. The glioma cell line used was A172, which contains GM<sub>2</sub> ganglioside as its sole ganglioside. A higher antibody reactivity was obtained in FACS analysis by treating the confluent cells with saponin for membrane permeabilization. This indicated that the cryptic gangliosides also existed on the surface of the plasma membrane. Immunoelectronmicroscopic studies revealed that many micro invaginations and pits were aligned along the plasma membrane, and GM<sub>2</sub> gangliosides were distributed in these structures. Inhibition of caveolae formation with filipin almost fully exposed cryptic GM<sub>2</sub> gangliosides of confluent cells. Western blotting revealed 'caveolin', which is caveolae specific protein, in A172 cells. These results revealed that these invaginations of the plasma membrane were actually the caveolae and that the mechanism of crypticity of gangliosides was regulated by these microdomains. Recently, many functions have been ascribed to caveolae, where such proteins as glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and low molecular G protein are concentrated, such as transcytosis, potocytosis, and transmembrane signal transduction. Crosslinking SDS-PAGE analysis showed GM<sub>2</sub> ganglioside in the caveolae associated with particular proteins. These proteins may possibly play significant roles in cell-to-cell interactions, or signal transduction.

(Received December 12, 1998 and accepted January 12, 1999)

**Key words:** Glioma, GM<sub>2</sub> ganglioside, Crypticity, Caveolae

## 1 緒 言

ヒト癌抗原の解析はハイブリドーマ法が確立された1975年以降種々のモノクローナル抗体を用いて研究が進められ、その多くは糖質抗原、糖脂質、糖蛋白質であることが判明した<sup>1-3)</sup>。なかでもメラノーマ、グリオーマ、神経芽細胞腫などの神経外胚葉由来の癌では癌関連抗原として多数のガングリオシドが同定されており<sup>4)</sup>、これらガングリオシドを認識する抗ガングリオシド抗

体の抗腫瘍活性の特性を用いた臨床応用が行われてきた。シアル酸を含む酸性糖脂質であるガングリオシドは細胞間の相互認識、細胞膜へのシグナル伝達系への調節因子として細胞の増殖、分化、そして癌化の調節機構に関与することが推察されてきたが<sup>5,6)</sup>、その作用機構は多くの点でいまだ不明である。

これまでに我々は、各グリオーマ細胞の膜表面ガングリオシドに対する抗体反応性がその抗原の絶対量に依存せず、細胞密度に大きく影響されることを見い出

し、糖鎖抗原が存在しながら抗体反応性が低下するいわゆる crypticity という現象について検討してきた<sup>7,8)</sup>。今回は更に膜透過性処理及び膜構造形成阻害をすることによる GM<sub>2</sub> ガングリオシドの抗体反応性について検討し、ガングリオシドの細胞膜上での局在を明らかにし、その抗原性発現のメカニズムについて検討、考察するとともに crypticity という機構の果たす細胞生物学的意義について検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 細胞

使用したヒトグリオーマ細胞株 A 172 は、Japanese Cancer Research Resources より入手した。

### 2.2 培養条件

10%ウシ胎児血清、0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用い 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で FALCON T-75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson, USA) フラスコに単層培養した。

### 2.3 膜透過性処理による GM<sub>2</sub> ガングリオシドの抗体反応性の解析

T-75 cm<sup>2</sup> フラスコに細胞密度が密な状態になるまで単層培養した A 172 の培養液を吸引除去後、0.05%サポニンを piperazine-1, 4-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES) バッファー [1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM O, O'-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 80 mM PIPES, 0.05%サポニン] として加え、室温 5 分間処理した。トリプシン-EDTA にて細胞を回収し、4%パラホルムアルデヒド液で固定した後、間接蛍光抗体法を行った。一次抗体として抗 GM<sub>2</sub> 抗体である GMB 28 (東京都臨床研、田井博士より供与) を使い室温にて 60 分間反応させ、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後二次抗体に fluorescein-conjugated goat affinity purified antibody to mouse immunoglobulins (Cappel) を室温にて 60 分間反応させ、0.5%ホルムアルデヒド液で固定し、Fluorescence activated cell sorter (FACS-Scan, Becton Dickinson, USA) にて解析した。

### 2.4 透過電子顕微鏡を用いた GM<sub>2</sub> ガングリオシドの標識

A 172 を細胞密度が粗な状態で  $\phi$  3.5 cm FALCON 培養皿 (Becton Dickinson) に培養し Zamboni 液で室温 60 分間固定後、1% bovine serum albumin (BSA) in PBS を用い 30 分間ブロッキングした。一次抗体は GMB 28 を用い 4°C で 60 分間反応させ、二次抗

体は anti-mouse IgM ( $\mu$ ), goat, F (ab') 2 fragment, Po, Gold EM 10 nm (フナコシ) を 100 倍希釈し 0.5 ml を用い 4°C で 60 分間反応させた。その後 1% OsO<sub>4</sub> で 4°C 60 分間固定し、10% sucrose 水溶液で 6 回洗浄、3% uranyl acetate 水溶液で室温 60 分間染色した。エタノールで脱水し、エポンで包埋後、培養皿からはがしウルトラミクローム (Sorvall, MT-6000) にて 90 nm 超薄切片を作成し、透過電子顕微鏡 (JEM-1200 EX, JEOL) を用い観察した。

### 2.5 膜小窩構造形成阻害剤処理後の GM<sub>2</sub> ガングリオシドの抗体反応性の解析

細胞密度が密の状態になるまで T-75 cm<sup>2</sup> フラスコに単層培養した A 172 に膜小窩構造の形成阻害、輸送障害作用のある filipin (Sigma)<sup>9)</sup> (5-20  $\mu$ g/ml), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Wako)<sup>10)</sup> (0.5-2  $\mu$ M) あるいは phorbol-12, 13-dibutyrate (PDbu) (Wako)<sup>11)</sup> (0.5-2  $\mu$ M) を投与し、filipin はさらに 15 分間、PMA, PDbu は 60 分間培養した。トリプシン-EDTA にて細胞を回収し、間接蛍光抗体法を行い、FACSscan にて解析した。

### 2.6 ウェスタンブロット法による caveolin 蛋白の同定

2.4 で認められた陥凹構造が caveolae といわれる構造であることの確認の目的で、A 172 細胞の抗 caveolin 抗体に対する特異性について検討した。

T-75 cm<sup>2</sup> フラスコに密な状態になるまで培養した A 172 細胞を PBS で洗浄後サンプルバッファー [250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8.4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol] を加え細胞を回収し煮沸、遠心分離した後、10% polyacrylamide gel を用いて sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った後ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に転写した。転写膜を室温で 5% skim milk-PBS に浸しブロッキング処理した後、250 倍に希釈した抗 caveolin 2 抗体 (Transduction-Laboratories) を一次抗体として室温 60 分間反応させた。対照として mouse の fibroblast である RSV-3 T3 Lysate (Transduction-Laboratories) を用いた。PBS で洗浄後、二次抗体として 20 倍希釈の biotin conjugated goat affinity purified antibody to mouse immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) (Cappel) と室温 60 分間、次いで avidin-biotin complex (Elite ABC キット, Vector Laboratories, Inc., USA) と室温で 60 分間反応させジアミノベンジジンを基質とし H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色させた。

## 2・7 Cross-linking による GM<sub>2</sub> ガングリオシドと物理的に近接した caveolae 内蛋白の同定

crypticity に関与していると思われる caveolae の細胞膜上における機能及びガングリオシドの役割について検討した。

### 2・7・1 アフィニティーカラムの作製

アフィゲル 10 (Bio-Rad) を 4°C の 10 mM sodium acetate pH 4.5 で活性化させ rabbit anti mouse IgM (Dako) と反応させた (4°C, 一夜)。翌日 1 M ethanolamine-HCl pH 8.0 で 4°C 60 分間ブロッキングした後、0.05 M glycine-HCl, 0.15 M NaCl pH 2.3 を加え 100 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) pH 8.0 で洗浄した。抗体と対照とする蛋白として BSA を同様の方法でアフィゲルと反応させた。

### 2・7・2 SDS-PAGE

2・5 と同様に細胞密度が密な状態で filipin 10 µg/ml を加え 15 分間細胞処理した A 172 をトリプシン-EDTA で回収し、抗 GM<sub>2</sub> 抗体 GMB 28 と室温 60 分間反応させた後、PBS の存在下で蛋白との架橋剤として BSOCOES (Wako) と室温 60 分間培養した。BSOCOES は dry dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し最終的に 1 mM の濃度となるよう調整した。0.1 M Tris pH 7.5 を加え反応を止め PBS で洗浄後、ライジングバッファー (0.5% NP 40, 50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.2 TIU/ml Aprotinin, 1 µg/ml PepstatinA, 20 mM Iodoacetamide, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.14 M NaCl pH 7.4) と水中 60 分間反応させた。BSOCOES の対照としては dry DMSO を加え以後同様の処理を行った。遠心分離後、上清を 2・7・1 に記載した方法で作製した anti mouse IgM アフィゲルカラムと 4°C, 一夜反応させた。翌日 0.01 M NaOH と 37°C, 2 時間反応させた後、0.05 M glycine-HCl, 0.15 M NaCl pH 2.3, 更に前述のサンプルバッファーを加え遠心分離、煮沸後 10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った。

### 2・7・3 銀染色法

銀染色法は Morrissey らの方法<sup>12)</sup> に従って行った。電気泳動を行ったゲルを 50% methanol, 10% acetic acid に、続いて 5% methanol, 7% acetic acid にそれぞれ 30 分間ずつ浸し、引き続き 10% glutaraldehyde にて 30 分間固定した。一夜蒸留水でリンスした後、0.5 mg dithiothreitol 100 ml に 30 分浸し、0.1% silver nitrate 100 ml で 30 分間処理し、37%

formaldehyde, 3% sodium carbonate で着色した。

## 3 成 績

### 3・1 膜透過性処理による GM<sub>2</sub> ガングリオシドの抗体反応性

A 172 の糖脂質組成は GM<sub>2</sub> ガングリオシド優位であることが知られている<sup>13)</sup>。今回のフローサイトメトリーによる解析では抗 GM<sub>2</sub> 抗体である GMB 28 の反応性はサポニンによる細胞膜透過性の処理<sup>14)</sup>により、37.5% の陽性率から 97.4% に上昇した。(Fig. 1)

### 3・2 透過電子顕微鏡を用いた GM<sub>2</sub> ガングリオシドの標識

A 172 の細胞膜直下に直径 100 nm 前後の陥凹構造や小胞構造が認められ、その内部に GMB 28 に標識したコロイド金粒子を認め、GMB 28 が小窩構造内に存在することが確認された。(Fig. 2)

### 3・3 膜小窩構造形成阻害剤処理による GM<sub>2</sub> ガングリオシドの抗体反応性の解析

フローサイトメトリーの解析の結果 filipin あるいは PMA, PDbu により細胞処理を施すことによりいずれの濃度においても陽性率はほぼ 100% となり、小窩構造の形成、輸送阻害することにより隠蔽されていた GM<sub>2</sub> ガングリオシドが細胞表面に露出されることが確認された。(Fig. 3)

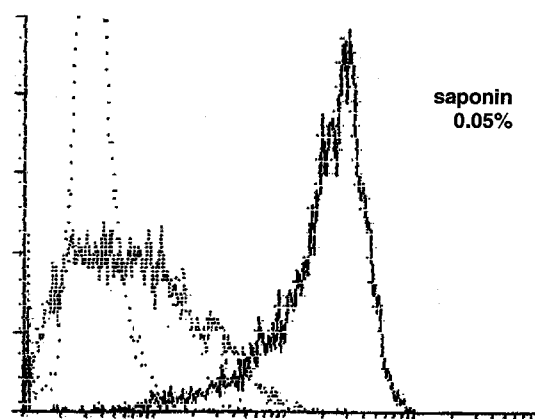
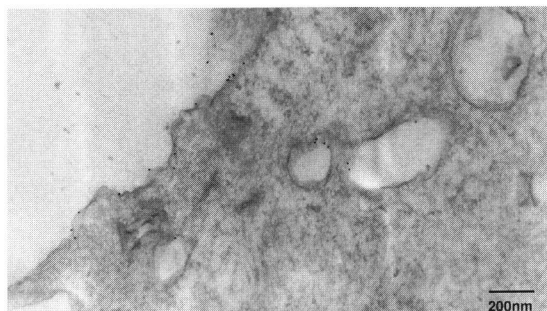


Fig. 1 FACS analysis of A172 cells stained with anti GM<sub>2</sub> ganglioside monoclonal antibody, GMB28. The thick line indicates the cells which were permeabilized with 0.5% saponin for 60min and were immunostained with GMB28. The thin line indicates the cells which were unpermeabilized. The negative control, reacted with 1% BSA in PBS for the primary antibody (dashed line).

### 3・4 A172 細胞における caveolin 蛋白の同定

Fig. 4 に示すように、分子量 20 kD の近くにバンドが認められ抗 caveolin 抗体が A 172 細胞の膜表面に存在する蛋白と特異的に反応することが確認された。



### 3・5 Cross-linking による GM<sub>2</sub> ガングリオシドと物理的に近接した caveolae 内蛋白の同定

Fig. 5 に示すように、GMB 28 と反応させ BS-OCOES とクロスリンクさせたサンプルのレーンでは、他のレーンでは認められないバンドが分子量約 50 kD の近くに数本確認された。

Fig. 2 Cell surface labeling of A172 cells with the gold particles. The cells were stained with GMB28 and gold particles before fixation and embedding in Epon. The gold particles are clustered in invaginations of the plasma membrane. Some of the pits are deeply invaginated.

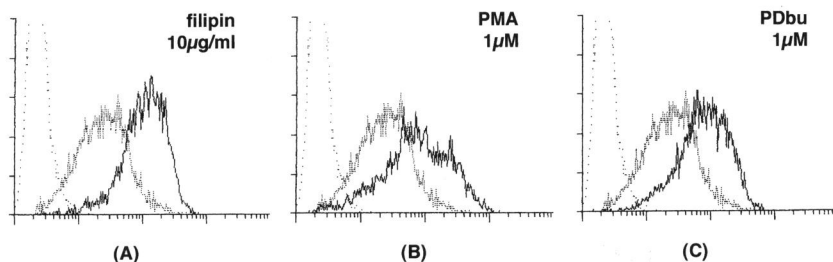


Fig. 3 FACS analysis of A172 cells. The thick lines indicate the cells treated with 10 μg/ml filipin(A), 1 μM PMA(B), and 1 μM PDBu(C) which were immunostained with GMB28. The negative control, reacted with 1% BSA in PBS for the primary antibody (dashed line). The cells without pretreatment are indicated by the thin lines.

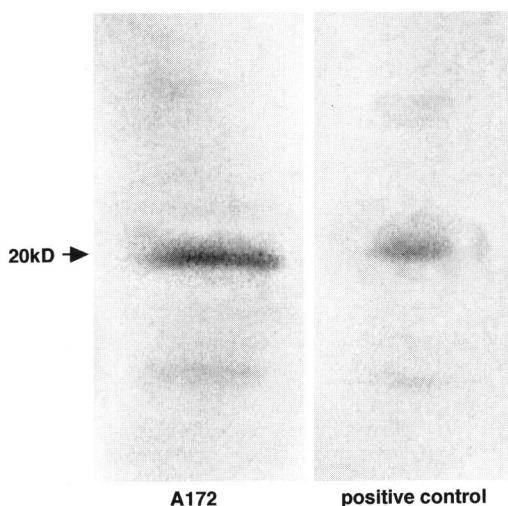


Fig. 4 Western blot analysis of A172 cells. Anti caveolin antibody demonstrated a 20kD band, which is consistent with the caveolin protein (left).

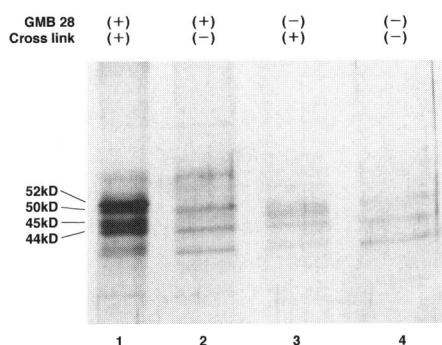


Fig. 5 Cross-linking study of GMB28 antibody. The cells were treated with filipin (10 μg/ml) to inhibit the internalization of caveolae. These cells were reacted with GMB28, followed by crosslinking with BSOCOES (lane1). The cross-linked proteins were electrophoresed after being recovered with GMB28 by affinity column for mouse IgM immunoglobulin. The controls lacked either GMB28 or BSOCOES or both (lane 2, 3, 4).

#### 4 考 察

ガングリオシドはその糖鎖部分に一分子以上のシアル酸を含む一群のスフィンゴ糖脂質である。特に脳神経系に大量に存在することから中枢神経系の発生、分化やその機能に重要な役割を果たしていると考えられ<sup>15,16)</sup>、多くの研究がなされてきた。抗ガングリオシド抗体は腫瘍マーカーとしての診断、あるいは強力な抗腫瘍活性を持つことからの抗体治療などの臨床応用が期待されたが、そのスフィンゴ脂質特有の反応性などから期待されていたほどの成果は得られなかった。

これまで我々は各グリオーマ細胞の抗ガングリオシド抗体に対する反応性が、抗原の絶対量に依存せず細胞密度に大きく影響されることを見出し、ガングリオシド糖鎖抗原の抗原が、存在しながら抗体反応性が低下するいわゆる crypticity という現象を獲得することを示してきた<sup>7)</sup>。この現象のメカニズムとして我々は、細胞密度の増加、つまり細胞間の接触の増加により細胞自身が形態、構造の変化をおこすことでガングリオシドが何らかの影響を選択的にうける可能性を示唆してきた<sup>8)</sup>。今回は更に膜透過性処理及び膜構造形成阻害によるガングリオシドの抗体反応性について検討し、ガングリオシドの細胞膜上での局在を明らかにしその抗原発現性のメカニズムについて検討、考察するとともに crypticity という機構の意義について検討した。

A 172 は糖脂質として GM<sub>2</sub> のみを多量に発現している細胞であり、これまでに細胞密度が密な状態で抗体反応性が低下することがわかっている<sup>8)13)</sup>。この細胞が密な状態で、細胞膜透過性を亢進させるサポニンを加えることにより、抗 GM<sub>2</sub> 抗体 GMB 28 に対する反応性が高率に陽性を示すことが認められた。これは抗体に反応しない、いわゆる隠れたガングリオシドも細胞膜上あるいは直下に存在する、という一つの可能性を示唆する現象と考える。これまで反応性のガングリオシドが細胞接着斑に一致した部分に多く分布されるという事象も確認されており<sup>8)</sup>、細胞表面膜上でのガングリオシドの局在がその抗原性発現に深く関与していることが推察された。

免疫電子顕微鏡では、細胞膜表面に直径 100 nm 前後の小陥凹および小胞様構造が認められ、その内部への GM<sub>2</sub> の局在が示唆される結果が得られた。スフィンゴ脂質の細胞機能の発現への関与に関する研究が進む中、細胞表面膜上に直径 50-100 nm の caveolae と呼ばれる特異な陥凹構造が存在することが認められている<sup>17)</sup>。GM<sub>1</sub> ガングリオシドに対して強い結合性をもつ

コレラ毒素  $\beta$  サブユニットを用いた細胞膜上の GM<sub>1</sub> の分布を観察すると、この caveolae と呼ばれる陥凹構造の内部あるいはその周辺に GM<sub>1</sub> が局在していることが認められた<sup>18,19)</sup>。現在のところ GM<sub>1</sub> 以外の糖脂質が caveolae に局在するかどうか明らかとはされていないが、今回観察された構造は形態的にもこの caveolae とよく類似しており、更に GM<sub>2</sub> ガングリオシドの caveolae への関与も強く示唆するものであると考えられた。

この caveolae には、糖脂質以外にも分子量 22 kD の膜蛋白質が局在していることが明らかにされている<sup>20)</sup>。caveolin と名付けられているこの蛋白質は血管内皮細胞、脂肪細胞、肺泡 1 型細胞といった caveolae 構造が豊富とされている細胞に発現が多く<sup>21)</sup>、また逆に caveolin を発現していない細胞では caveolae 構造もないことも示され<sup>22)</sup>、この膜蛋白質は caveolae 構造に不可欠な因子と考えられている。また細胞内のコレステロール量の減少やコレステロール結合性の薬剤で細胞処理することにより caveolae の機能を阻害するだけでなく、形態的にも caveolae は平たく形態変化をおこし陥凹構造が損なわれることも見出されており<sup>20)23)</sup>コレステロールも caveolae 構造には必須の因子と考えられている。filipin は nystatin, digitonin などと共にコレステロール結合性の薬剤であり、caveolae や caveolin 様構造を損なわせる作用を持つことが分かっている<sup>9)</sup>。今回細胞密度が密な状態で filipin などを用い細胞処理を行うと、その濃度にかかわらずいずれの場合においても抗 GM<sub>2</sub> 抗体に対する反応性は高率に陽性となることが確認された。またウエスタンブロット法により分子量 20 kD 近くにバンドが確認され、抗 caveolin 抗体に対する特異性が認められたことから、A 172 細胞における caveolin 様の膜蛋白の存在が推測され、電顕で確認された陥凹構造が caveolae といわれている構造であろうことが考えられた。

すなわち filipinなどで細胞処理をすることにより caveolae の陥凹構造が損なわれ、そこに局在していたいわゆる隠れたガングリオシドが細胞膜表面に浮かび上がり、抗体反応性が回復されたのではないかと考えられる。細胞密度の増加いいかえれば細胞間接触の増加により、細胞表面に形態変化がおこり caveolae を形成し、選択的にガングリオシドを局在させる、すなわちこれまで我々が推察してきた crypticity 現象獲得のメカニズムとして caveolae の深い関与が考えられると共に、GM<sub>2</sub> ガングリオシドの局在が確認された。

この caveolae の細胞膜上の機能については現在でも

不明な点が多い。物質の細胞膜間における膜動輸送、いわゆるトランスサイトシスやあるいは小分子の特異な取り込み（ポトサイトシス）への関わりなどが示唆されてきたが<sup>24,25)</sup>、最近、この caveolae には GM<sub>1</sub>、コレステロールなどと共に Src ファミリーキナーゼ、三量体 G 蛋白質や glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー蛋白質といった情報伝達系において重要な役割を担う分子が存在し、これらが介在する細胞膜の情報伝達の局所的な場としての注目が集められている<sup>26,27)</sup>。filipin 処理した A 172 と抗 GM<sub>2</sub> 抗体 GMB28 を反応させ、BSOCOES でクロスリンクした後 anti mouse IgM アフィゲルカラムと反応させたところ、銀染色法にて分子量約 50 kD の近くで何らかの蛋白質がクロスリンクされたことが確認された (Fig. 6)。GPI アンカー蛋白質は糖脂質とマイクロドメインを形成し、このマイクロドメインと caveolae の間を GPI アンカー蛋白質が移動しつつ情報伝達でさまざまな機能を果た

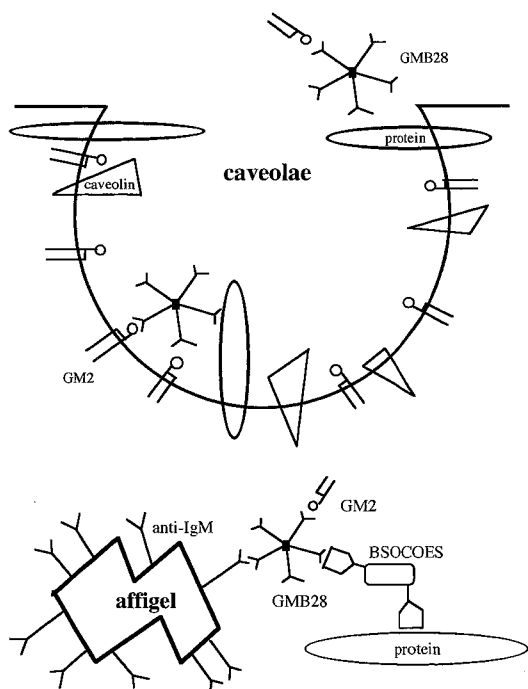
しているという説も示されており<sup>17)</sup>、今回このクロスリンクされた蛋白質は、はたしてただ単に caveolae を構成するだけの構造蛋白質かあるいは caveolae に局在する GM<sub>2</sub> ガングリオシドと関連し細胞間情報伝達の面において何かしらの役割を担っている分子と期待されるものである。今後この蛋白質の同定、解析を進め、細胞増殖、分化などを調節する細胞間のシグナル伝達機構の解明及びガングリオシドの役割が明らかにされるものと思われる。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました札幌医科大学医学部脳神経外科学講座端和夫教授に深甚なる謝意を表します。また研究に際し終始御指導、御教示いただきました同脳神経外科学講座八巻聡明博士に心から深謝いたします。最後に御助言、御協力頂きました脳神経外科学講座教室員各位に感謝いたします。

#### 参 考 文 献

1. Hakomori S, Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 1983, 71: 231-251.
2. Marcus DM. A review of the immunogenic and immunomodulatory properties of glycosphingolipids. *Mol Immunol* 1984, 21: 1083-1091.
3. Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 1985, 314: 53-57.
4. Reisfeld RA, Cheres DA. Human tumor antigens. *Adv Immunol* 1987, 40: 323-377.
5. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. *J Biol Chem* 1990, 265: 18713-18716.
6. Hakomori S, Igarashi Y. Gangliosides and glycosphingolipids as modulators of cell growth, adhesion, and transmembrane signaling. *Adv Lipid Res* 1993, 25: 147-162.
7. 帯刀光史. グリオーマ細胞株 KG1C の細胞膜糖脂質抗原ガングリオシド GM<sub>3</sub> の crypticity 獲得機構の解析. *札幌医誌* 1996, 65: 301-312.
8. 吉川純平. ヒトグリオーマ細胞におけるガングリオシド代謝速度の細胞密度依存性の検討. *札幌医誌* 1997, 66: 283-291.
9. Smart EJ, Mineo C, Anderson RG. Clustered folate receptors deliver 5-methyltetrahydrofolate to cytoplasm of MA104 cells. *J Cell Biol* 1996, 134: 1169-1177.
10. Smart EJ, Foster DC, Ying YS, Kamen BA,



**Fig. 6** Schematic diagram of caveolae. Caveolae is flask-shaped plasma membrane invaginations. Caveolin, an integral membrane protein, is the principal structural component of caveolae and GM<sub>2</sub> gangliosides are distributed in these small pits. Affinity column for mouse IgM immunoglobulin reacts with GMB28 antibody cross-linked with some adjacent caveolae proteins.

- Anderson RG. Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1994, 124: 307-313.
11. Smart EJ, Ying YS, Anderson RG. Hormonal regulation of caveolae internalization. *J Cell Biol* 1995, 131: 929-938.
12. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 1981, 117: 307-310.
13. 前田義裕. ヒトグリオーマ細胞株の糖脂質分析と抗 GM<sub>3</sub> および GM<sub>2</sub> 抗体の反応性の解析. *札幌医誌* 1995, 64: 109-118.
14. Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 1993, 12: 1597-1605.
15. Irwin LN, Irwin CC. Developmental changes in ganglioside composition of hippocampus, retina, and optic tectum. *Dev Neurosci* 1979, 2: 129-138.
16. Kojima N, Kurosawa N, Nishi T, Hanai N, Tsuji S. Induction of cholinergic differentiation with neurite sprouting by de novo biosynthesis and expression of GD3 and b-series gangliosides in neuro2a cells. *J Biol Chem* 1994, 269: 30451-30456.
17. Parton RG, Simons K. Digging into caveolae. *Science* 1995, 269: 1398-1399.
18. Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 1982, 296: 651-653.
19. Parton RG. Ultrastructural localization of gangliosides; GM<sub>1</sub> is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 1994, 42: 155-166.
20. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992, 68: 673-682.
21. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 1994, 127: 1233-1243.
22. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 1994, 269: 30745-30748.
23. Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 1993, 120: 1147-1157.
24. Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, Simionescu N. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol* 1986, 102: 1304-1311.
25. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995, 108: 2369-2379.
26. Anderson RG. Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 10909-10913.
27. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang ZL, Harmanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: Implications for human disease. *J Cell Biol* 1994, 126: 111-126.

別刷請求先:

(〒 060-8543) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

札幌医科大学医学部脳神経外科学講座 布村克幸